FACULTATEA DE MEDICINĂ DIN BUCUREŞTI

No. 1964.

CERCETARI
ASUPRA STAFILOLYSINEI
ŞI
PRODUCŢIEI EXPERIMENTALE DE ANTISTAFILOLYSINĂ

TEZĂ

PENTRU

DOCTORAT ÎN MEDICINĂ ŞI CHIRURGIE

Lucrare prezentată şi susţinută la . . . 1923

DE

CORNELIA POPESCU

Asistentă la Institutul de seruri şi vaccinuri

BUCUREŞTI

TIPOGRAFIA „CULTURA", STR. CÂMPINEANU, 15

1923

Deacn: D-nul Prof. Dr. Minovici Mina

Profesori titulari:

Clinica II-a chirurgicală	D-l Dr.	**Angelescu C.**
Chimia medicală	„ „	**Athanasescu N.**
Clinica chirurgicală infantilă şi ortopedie	„ „	**Bălăcescu I.**
Anatomia patologică Bacteriologia şi patogenia experimentală	„ „	**Babeş V.**
Istologia normală şi Istogeneză	D-l Dr.	**Besnea St.**
Medicina experimentală	„ „	**Cantacuzino I.**
Clinica genecologică	„ „	**Daniel C.**
Clinica a II-a medicală	„ „	**Danielopol D.**
Anatomia topografică II	„ „	**Gerota D.**
Farmacia chimică şi galenică	„ „	**Georgescu M.**
Clinica şi teoria obstetricală	„ „	**Gheorghiu N.**
Anatomia topografică I Clinica I chirurgicală	„ „	**Ionescu Th.**
Clinica III-a medicală	„ „	**Ionescu D.**
Clinica III-a chirurgicală	„ „	**Juvara E.**
Clinica boalelor căilor urinare	„ „	**Jianu A.**
Farmacologia şi materia medicală	„ „	**Lalu S.**
Clinica boalelor oto-rino-laringologice	„ „	**Meţeanu N.**
Clinica boalelor nervoase	„ „	**Marinescu Gh.**
Chimia analitică	„ „	**Minovici Şt.**
Clinica infantilă	„ „	**Manicatide M.**
Igiena şi poliţia sanitară	„ „	**Mezinescu D.**
Medicina legală	„ „	**Minovici M.**
Oftalmologia şi clinica oftalmologică	„ „	**Manolescu D.**
Clinica I-a medicală	„ „	**Nanu-Muscel I.**
Clinica dermatologică şi sifiligrafică	„ „	**Nicolau St.**
Clinica mentală	„ „	**Obregia Al.**
Fiziologia umană	„ „	**Paulescu N.**
Patologia generală	„ „	**Proca Gh.**
Anatomia descriptivă şi embriologia	„ „	**Rainer Fr.**
Zoologia medicală	„ „	**Sihleanu Şt.**
Botanica medicală	„ „	**Solacolu T.**
Patologia medicală	„ „	**Thomescu I. Th.**
Clinica terapeutică	„ „	**Theohari A.**
Analiza alimentelor şi băuturilor	„ „	**Vintilescu I.**

PROFESORI AGREGAŢI:

Medicină operatoare	„ „	**Constantinescu C.**

JURIUL DE PROMOŢIUNE

Preşedinte: **D-l Prof. Dr. CANTACUZINO I.**

Membrii
- **D-l Prof. Dr. Proca G.**
- **„ „ „ Mezincescu D.**
- **„ Conf. „ Mironescu D.**
- **Docent Dr. Dumitrescu-Mante**

Facultatea consideră opiniunile expuse în această lucrare ca proprii ale autorului şi nu are a exprima, nici aprobare, nici dezaprobare.

Memoriei tatălui meu.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545818_0063

INTRODUCERE

Proprietatea hemolitică a anumitor rase de stafilococ a fost semnalată întâi de *Krauss* în 1900 (12). Acest autor observase faptul că anumite specii de globule roşii sunt hemolizate de către culturile de stafilococ.

Technica pentru prepararea stafilolysinei a fost însă stabilită de *Neisser şi Wechsberg* (16) şi în curs de 20 ani aproape nu a suferit schimbări. Aceşti autori au indicat alcalinitatea optimă a mediului pentru producerea lysinei în culturi şi data când ajunge la maximum (8-a—13-a zi); deasemenea rezistenţa ei la căldură. In ceeace priveşte influenţa pe care ar avea-o diferitele grade de temperatură asupra producţiei de stafilolysină, în lucrările lor nu se găsesc indicaţiuni precise.

In ultimii ani, de când se studiază mai amănunţit influenţa principalilor factori cari determină toate procesele biologice şi anume: concentrarea mediului în ioni Hidrogen, temperatura şi timpul, condiţiunile necesare producerii de stafilolysină au fost mai precis lămurite.

Lucrarea lui *Walbum* (21) asupra modului de elaborare al toxinelor bacteriene constitue studiul cel mai complect asupra toxinei stafilococice. După ce arată rolul cel mare pe care-l joacă concentrarea mediului în ioni Hidrogen, tempe-

ratura şi timpul în creşterea stafilococului şi producerea de stafilolysină, în a 2-a parte a lucrării studiază importanţa compoziţiei cantitative a mediului în ceeace priveşte principalele elemente constitutive ale lui: maceratul de carne, peptonă şi Na. Cl. Totuşi chiar când toate aceste elemente sunt bine stabilite procesul intim al formării toxinei e aşa de complex şi atârnă probabil de factori pe cari nu-i cunoaştem încă, încât nu putem fi siguri de mersul elaborării unei toxine, chiar când technica întrebuinţată a fost totdeauna aceiaşi.

In cercetările pe cari le-am întreprins asupra imunizării animalelor cu această toxină am procedat prin:

I. Studiul prealabil al condiţiunilor optime pentru producerea ei şi ca urmare, am reluat în parte cercetările lui Walbum mai sus menţionate.

II. Cercetarea puterei anti-hemolitice naturale a serului animalelor întrebuinţate — iepuri —

III. Căile de imunizare: cea intra-musculară şi cea venoasă şi am putut face un mic studiu comparativ asupra rezultatelor obţinute.

IV. Rolul plachetelor în elaborarea antitoxinei.

CERCETĂRI EXPERIMENTALE

I. Condițiunile optime pentru producerea unei stafilolysine active.

Pentru prepararea stafilolysinei am reluat datele indicate de Walbum ca optime pentru desvoltarea ei. El își prepară bulionul în modul următor:

La 250 gr. carne de vițel, foarte proaspătă care nu a fermentat deloc, adaogă 1000 cmc. apă și 10 gr. peptonă. Elimină clorurul de Na deoarece din cercetările sale reese că producția de lysină e cu atât mai mare cu cât concentrația mediului în Na. Cl. e mai mică.

Cantitatea maximă de toxină se obține într'un astfel de bulion cu Ph inițial de 6 și cultivat la temperatura de 35° C. După Walbum între a 2—4 zi mediul devine mai acid, apoi alcalinitatea se urcă treptat în zilele următoare și are tendința să ajungă între Ph 8—9. Formarea de lysină urmează o creștere, ajunge un maximum în jurul punctului neutral, apoi slăbește pe măsură ce alcalinitatea crește. In aceste condiții lysina atinge maximum în 5 zile.

Există deci o legătură strânsă între variațiile concentrației în ioni hidrogen și desvoltarea de lysină, aceasta atingând maximum când reacția mediului e ușor alcalină.

Experienţele au fost începute cu 3 tulpini de stafilococ auriu, virulenţi, izolaţi în cursul anului 1922 şi anume:

1. Stafilococ No. 3. izolat din flegmon — Martie, 1922.

2. Staf. P. izolat dintr'un abces în regiunea parotidiană — Septembrie, 1922.

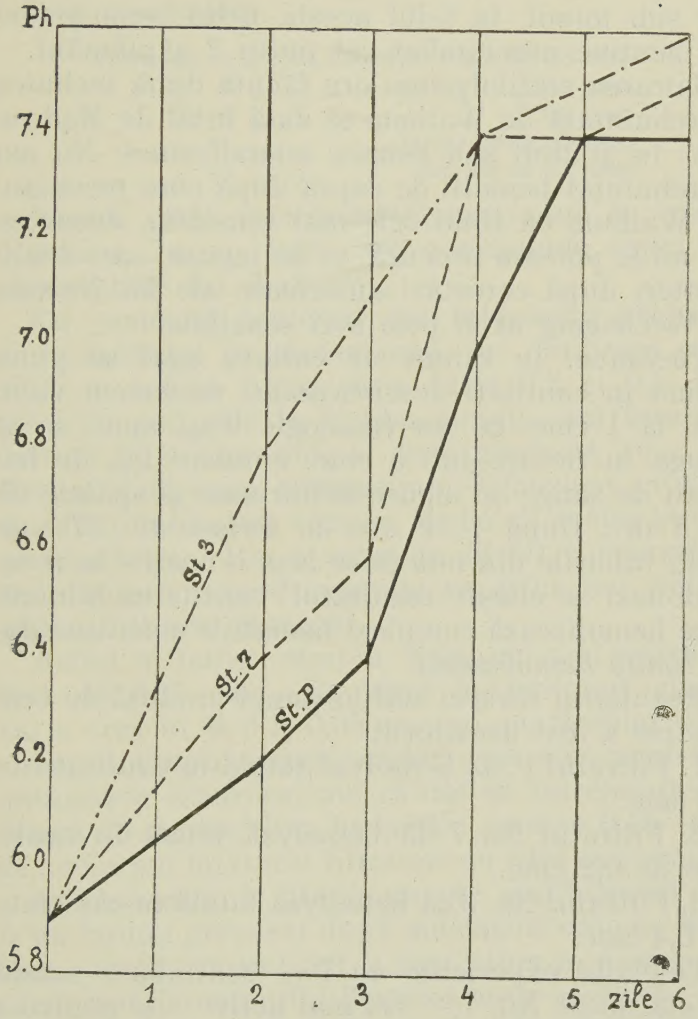
3. Stafilococ No. 7. izolat din furunculoză — Februarie, 1922.

Am plecat cu fiecare din aceste 3 surse dela o singură colonie izolată pe geloză.

O serie de 3 flacoane Erlenmayer capacitate 250 cmc. conţinând fiecare 100 cmc. bulion cu Ph. 5,9; au fost însămânţate cu câte o ansă de cultură pe geloză de 24 ore din fiecare sursă. Flacoanele erau puse în termostat la temperatura de 36°.

Cercetând zilnic Ph-ul în flacoanele însămânţate am stabilit următoarele curbe în timp de 6 zile.

	Ph. initial	II-a zi	III-a zi	IV-a zi	V-a zi	VI-a zi
Staf. P.	5 9	6.2	6.4	7.00	7.4	7.4
Staf. 7 .	5.9	6.4	6.6	7.4	7.4	7.5
Staf. 3 .	5 9	6.8	7.1	7.4	7 5	7.6



Se vede din aceste curbe că reacţia mediului ajunge între 4-a—6-a zi circa Ph 7,4—Ph. 7,6. Nu am constatat scăderea Ph-ului menţionată de Walbum în nici una din cele 3 culturi.

Culturile au fost filtrate a 6-a zi prin lumânări Chamberland L^3, iar filtratul păstrat la ghe-

ţar sub toluol. In felul acesta titlul hemolysinei se menţine neschimbat cel puţin 2 săptămâni.

Titrarea stafilolysinei era făcută după technica întrebuinţată de Walbum şi dată întâi de Madsen (15) în studiul său asupra tetanolysinei. Nu am întrebuinţat hematii de capră după cum recomandă Walbum ca fiind cele mai sensibile, deoarece nu mi-le puteam procura, ci de iepure, cari dealtminteri după cercetări anterioare ale lui Neisser şi Wechsberg ar fi cele mai sensibile.

Technica. In tuburi de calibru egal se pune lysina în cantităţi descrescânde; readucem volumul la 1 cmc. cu ser fiziologic 9‰, apoi, se adaugă în fiecare tub 5 cmc. emulsie 1% de hematii de sânge de iepure defibrinate şi spălate de 2—3 ori. După 1—2 ore de termostat (37°) se agită tuburile din nou şi se lasă o noapte la rece. A douazi se citeşte rezultatul: cantitatea minimă care hemolizează complect hematiile constitue *doza limită hemoluzantă.*

Rezultatul titrărei stafilolysinei produsă de cele 3 surse a fost următorul.

1. Filtratul P. dă hemolyză totală în cantitate de 0,3 cmc.

2. Filtratul No. 7 dă hemolyză totală în cantitate de 0,2 cmc.

3. Filtratul No. 3 dă hemolyză totală în cantitate de 0,4 cmc.

Celelalte experienţe au fost continuate numai cu stafilococ No. 7 — cel mai activ — şi pentru a stabili precis în câte zile lysina atinge maximum, o serie de 5 flacoane Erlenmayer au fost însămânţate cu aceiaşi cantitate de emulsie microbiană — 3 picături. Culturile au fost filtrate după 5 zile, 7 zile, 9 zile, 11 zile, 13 zile (Ph-ul ajunsese a 12-a zi 8.2), iar titrarea făcută odată cu toată seria de filtrate.

Iată rezultatele:

Filtrat de	5	zile	de	hemolyză	totală	cu	0 5 cmc.
„ „	7	„	„	„	„	„	0,2 cmc.
„ „	9	„	„	„	„	„	0,5 cmc.
„ „	11	„	„	„	incompletă		0,5 cmc.
„ „	13	„	„	„	parţ ală	cu	0 5 cmc.

Pentru sursa întrebuinţată, maximum de lysină e deci a 7-a zi, fapt care corespunde exact cu observaţiile lui Walbum.

Cu toate că bulionul era totdeauna preparat şi însămânţat în acelaş mod, nu obţineam o lysină cu acelaş titru: varia între 0,2 şi 0,5. Paralel cu culturile în bulion simplu, am încercat culturi în acelaş bulion, însă glucozat 1%₀₀. De fiecare dată erau însămânţate 2 flacoane ce conţineau, unul bulion simplu, iar celalt acelaş bulion glucozat 1%₀₀. Din o serie de titrări comparative am obţinut în mod constant un titlu mai ridicat pentru filtratul glucozat.

Astfel în bulion simplu, titlul cel mai ridicat a fost de 0,15 cmc., pe când în bulionul glucozat a crescut la 0,1, 0,05 cmc. şi odată chiar 0,03.

In tot timpul experienţelor, mai ales pentru imunizarea iepurilor, am căutat să întrebuinţez o lysină cu acelaş titru hemolitic, anume 0,15—0,1, de aceea am înlăturat filtratele cu titlu mai scăzut.

In Rezumat. 1. Maximum de stafilolysină într'un bulion preparat după indicaţiile date de Walbum, cu Ph. iniţial 5,9, a fost atins în momentul când reacţia mediului devenea uşor alcalină (Ph. 7.5) adică între a 5-a—7-a zi. 2. Adăogând acestui bulion glucoză în proporţie de 1%₀₀ se obţine o hemolysină al cărui titru e crescut în mod simţitor.

II. **Studiul antistafilolysinei în serul iepurelui normal.**

E cunoscut faptul *[Ehrlich, Neisser, Krauss* şi *Clairmont* (12), *Eisler* (4, 5), *Krauss* şi *B. Lipschütz* (14)], că serurile normale posedă antihemolysine naturale şi în acelaş timp specifice. Această specificitate o denotă faptul că un ser normal, bunăoară cel de cal, are o puternică antihemolysină contra lysinei tetanosului şi stafilococului, dar o foarte slabă antivibriolysină. Serul normal de porc are o antivibriolysină şi o antitetanolysină dar nici urmă de antistafilolysină.

Pe de altă parte, Neisser îndepărtând într'un ser de cal antistafilolysina normală titrată prin o cantitate suficientă de stafilolysină, acesta rămâne cu antitetanolysina.

Krauss şi *Clairmont* au arătat că serul unei capre imunizate contra vibriolsyinei, neutralizează în diluţii foarte mari chiar doze multiple de toxină, pe când antistafilolysina titrată înainte de imunizare rămâne neschimbată.

Faţă de stafilococ, serul normal de cal şi cel de om au o putere antihemolytică marcată. Mai slabă e puterea serului normal de bou. Cât despre serul normal de cobai şi de iepure, Neisser le consideră ca lipsite de o acţiune împedecătoare faţă de lysina stafilococului, de aceea chiar sfătueşte să nu se mai

spele hematiile de iepure, necesare titrării hemolysinei.

*
* *

Inainte de a începe imunizarea iepurilor cu filtrate de stafilococ, am întreprins o serie de titrări asupra serurilor a 40 iepuri normali pentru a le stabili puterea antihemolytică naturală. Sângele a fost recoltat din vena marginală a urechii, frecată prealabil cu toluol ca să devie turgescentă. Intepând vena cu un ac scurt şi gros se poate lesne culege circa 8 cmc. sânge, care coagulându-se dă o cantitate suficientă de ser pentru titrare.

Technica. Intr'o serie de tuburi (calibru egal) cu doze crescânde de ser dela 0,05—1 cmc., aduse la acelaş volum cu ser fiziologic, se adaogă doza limită hemolyzantă de toxină; se ţine $^1/_2$ oră la 37°. In urmă se adaogă în fiecare tub 5 cmc. emulsie de globule roşii de iepure 1% şi se lasă iar 2 ore la 37°. Odată scoase din termostat se agită bine se pune totul la rece iar a douazi se citesc rezultatele.

Titrările au fost făcute în 4 rânduri (odată 15, 12, 5 şi 8). Stafilololysina nu a fost aceiaşi de fiecare dată, însă era titrată cu o zi înainte, pentru ca să adaog exact doza limită hemolyzantă.

Iată tabloul cu rezultatele obţinute:

1	ser	împiedică	complect	h	moly	a	în cantitat	de 0,05 cc.
1	„	„	„	„	„	„	„	0,1 „
4	seruri	„	„	„	„	„	„	0,15 „
3	„	„	„	„	„	„	„	0,25 „
8	„	„	„	„	„	„	„	0,50 „
4	„	„	„	„	„	„	„	1 cmc.
9	„	„	incomplect	„	„	„	„	1 cmc.
13	„	nu	împiedică	deloc	hemolyza	în	cantitate	de 1 cmc.

Ceeace raportat la 100 seruri dă următorul procent:

2,50 %	împiedică	total	hemolyza	în	cantitate	de	0,05
2,50 %	„	„	„	„	„	„	0 1
10 %	„	„	„	„	„	„	0,15
7,5 %	„	„	„	„	„	„	0,25
7 5 %	„	„	„	„	„	„	0,50
5 %	„	„	„	„	„	„	0,75
10 %	„	„	„	„	„	„	1 cmc.
22 %	„	incomplect	„	„	„	„	1 cmc.
32,5 %	nu	împiedică	deloc	hemolyza		„	1 cmc.

Rezultă din aceste titrări că variaţiunile obţinute între dozele împedicătoare sunt destul de mari dela un animal la altul (dela 0,05 cmc. până la 1 cmc şi mai mult). De aceea, pentru a evita orice eroare în aprecierea creşterii titrului unui ser în curs de imunizare trebue neapărat să-i cunoaştem puterea împedicătoare naturală. Astfel se poate întâmpla să considerăm un ser de 100 ori mai puternic ca cel normal când de fapt e numai de 10 ori.

III. **Calea optimă pentru imunizare.**

In serul animalelor imunizate cu hemolysină se desvoltă foarte uşor o antitoxină specifică. Pentru a obţine o toxină cât mai activă, dintre cele 3 căi întrebuinţate pentru inoculări şi anume: subcutană, intravenoasă şi peritoneală, cea subcutanată a dat cele mai bune rezultate. Neisser şi Wechsberg încep injecţiunile la iepure şi capră cu doze mici de 0,2 cmc. filtrat. Două sau trei injecţii de toxină activă sunt suficiente pentru a obţine o antihemolysină activă. Cât despre calea peritoneală şi cea intravenoasă rezultatele obţinute sunt foarte inconstante, iar Neisser numai într'un singur caz a putut obţine o antitoxină destul de slabă prin această din urmă cale.

De asemenea dintre cele 2 metode: 1) prin o serie de injecţii cu doze crescânde sau 2) o injecţie cu doza maximă suportabilă, prima produce un ser mult mai bogat în anticorpi ca cea de a doua [Famulener (6)].

* * *

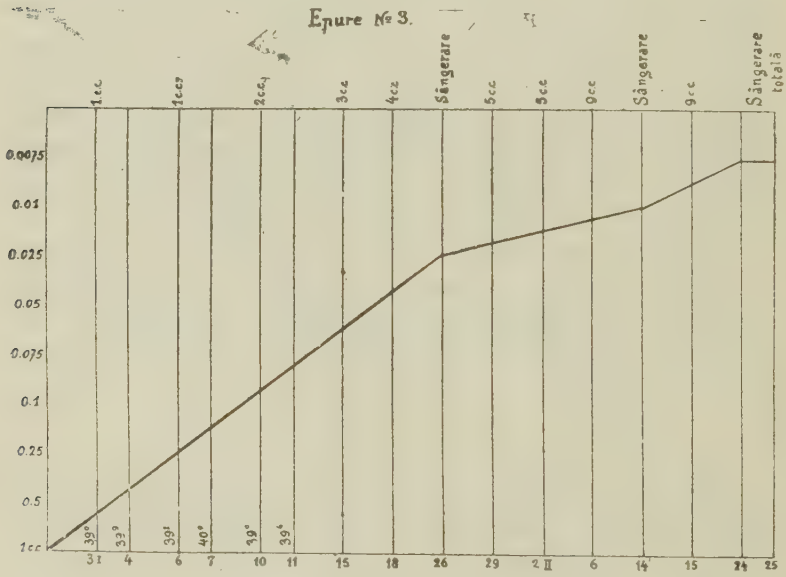
Am întrebuinţat metoda injecţiilor multiple şi am înlocuit calea subcutană cu cea intramusculară. Intr'o primă serie — de 4 iepuri — am început imunizarea pe 2 căi: intramusculară şi intravenoasă.

Injecţiile intramusculare erau făcute în coapsă. După primele inoculări, temperatura iepurilor se ridica cu un grad şi se menţinea astfel 24 ore.

In acelaș timp iepurii slăbeau. La locul de inoculare se producea uneori o induraţie, niciodată însă necroză.

Pe lângă faptul că prin această cale am obţinut un ser destul de puternic, avantajul ei asupra celei subcutane cred că stă în faptul că nu se produc accidentele locale (infiltraţie, necroza pielei) destul de frecvente în calea subcutană. Am început injecţiile cu 1 cmc. toxină activă și pentru mărirea dozelor — maxima a fost de 9 cmc. filtrat — m'am condus de variaţiile în greutatea animalului.

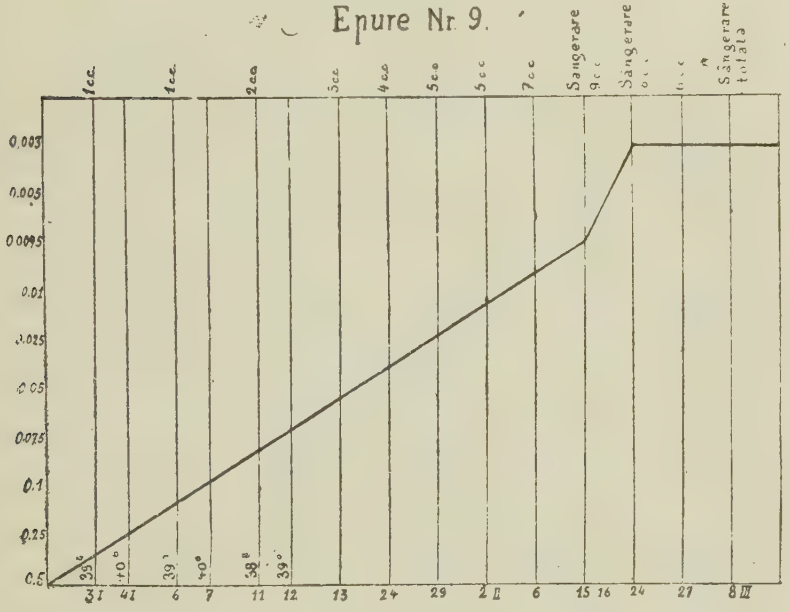
Iată curbele de imunizare a câtorva din iepurii inoculaţi pe cale intramusculară.



Epure No. 3. Gr. 2.300 gr.
Serul normal împiedică hemoliza în doză de 1 cmc.

Ordonatele indică data când au fost făcute injecţiile și cantităţile introduse. Abscisele arată di-

luția de ser care împedecă total hemoliza, începând cu doza de ser care împedeca hemoliza înainte de începutul imunizării. Pentru sângerarea de probă sângele era cules tot din ureche. Serul înainte de titrare era încălzit $^1/_2$ oră la 56°.



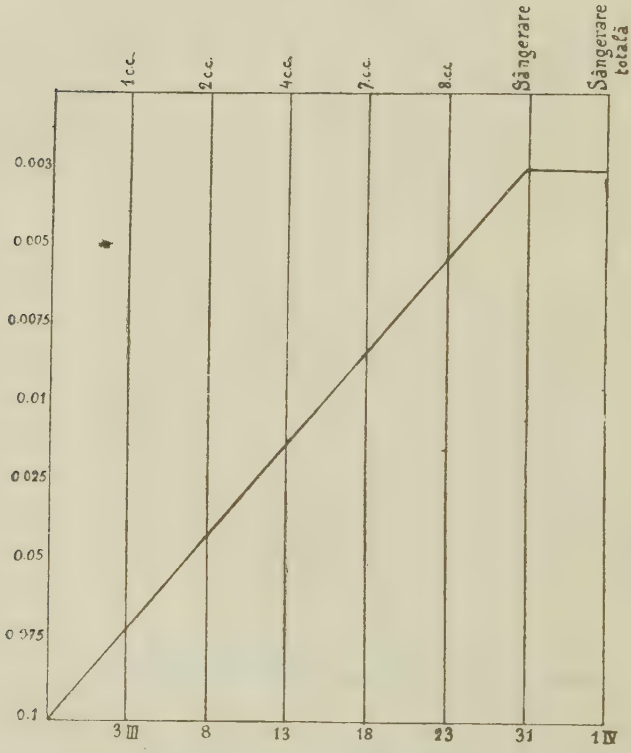
Epure No. 9. Gr. 2 200 gr.
Serul normal împiedică hemolyza în doză de 0.5.

Injecțiile pe cale intravenoasă au fost începute cu 0,5 cmc. filtrat. Unul din iepuri a murit de de pneumococcie în cursul imunizării. Celalt care începuse să fie imunizat odată cu epurele No. III și căruia i s'a luat sânge de probă la aceiași dată (26. I), după 5 injecții, a dat un ser cu acelaș titru ca înainte de începutul imunizării. De aceea am renunțat la calea intravenoasă și am urmat

imunizarea celorlalţi iepuri numai prin injecţii intramusculare.

Stafilolysina se comportă deci ca orice toxină solubilă pentru care injecţiile intramusculare şi

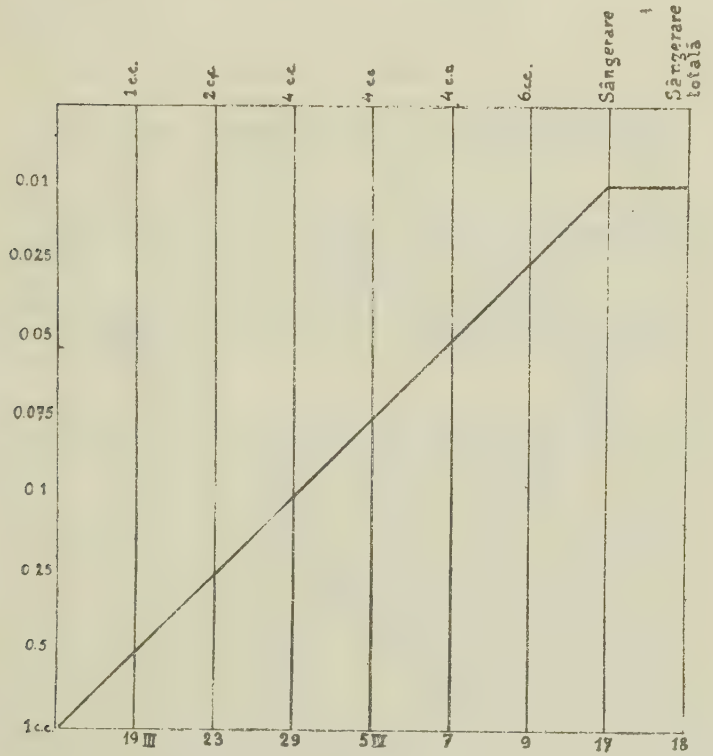
Epure Nr. 11.



Epure No. 11. Grenfate 1 670 gr.
Serul normal împiedică hemolyza în doză de 0,1 cmc.

cele subcutane constitue calea de preferat în prepararea serurilor antitoxice, în vreme ce serurile antimicrobiene cele mai puternice se obţin prin injecţii intravenoase şi intraperitoneale.

Faptul că serul unui animal normal posedă o putere împedicătoare naturală mare pare că nu influenţează producţia de anticorpi în timpul imunizării.



Epure No. 15. Greutate 1.900 gr.
Serul normal nu împiedică deloc hemoliza în doză de 1 cmc.

Astfel epurele No. 15 al cărui ser normal nu împedica hemolyza nici în cantitate de 1 cmc., a dat un ser titru crescut de 100 ori, pe când epurele No. 11 al cărui ser normal împedica hemoliza în cantitate de 0,1 a dat un ser cu titru crescut abia de 30 ori. (ambii primind aceiaşi cantitate de toxină).

IV. **Rolul plachetelor în elaborarea antitoxinei.**

Cercetările asupra rolului plachetelor în imunitatea naturală şi cea căpătată sunt încă de dată foarte recentă. Ele încep cu observaţiile lui *Aynaud* (2) care constată că adăogând sângelui — in vitro — emulsie microbiană, chiar după 10 minute plachetele încep să se aglutineze în masse în cari se prind microbi şi leucocite.

De asemenea observase că în vivo, după o injecţie cu microbi, survine o leucopenie prin aglutinare, plachetele regăsindu-se în capilare şi ficat.

Aynaud nu a pus însă în legătură acest fenomen cu eliminarea microbilor din circulaţie.

In urmă cercetările lui *Delrez* şi *Govaerts* (3) apoi ale lui *Govaerts* (7, 8, 9) au stabilit rolul important pe care-l joacă plachetele în lupta organismului, contra microbilor. Injectaţi în curentul circulator, unii microbi nevirulenţi sau prea puţin virulenţi pentru animalul cu care se experimentează sunt imediat aglutinaţi de globuline iar grămezile eliminate. Mai mult dacă unui animal — cobai — injectat prealabil cu un microb îi introduce în circulaţie plachete spălate, în mod constant numărul microbilor scade mai repede din circulaţie decât la un animal martor. Acelaş fenomen se petrece când se injectează hematii sau particule inerte — cerneală de China de exemplu.

Plachetele ar juca deci un rol comparabil în parte cu acel al fagocitelor, mult mai rapid însă, deoare-

ce acțiunea lor se produce chiar în marea circulație. Ele ari fi prima barieră care se opune corpilor străini intrați în circulație.

Rămânea de văzut dacă acest rol e activ sau pasiv.

Roskam (19) a reluat experiențele lui Govaerts și a ajuns la concluzia că facultatea de aglutinare a plachetelor e datorită păturii de plasmă care aderă de ele. In adevăr spălând plachetele de multe ori (6–8 ori) ele perd facultatea de a aglutinà corpi streini. Rolul lor ar fi deci pur și simplu pasiv. Govaerts presupunea că facolarea microbilor de plachete e consecința acțiunii opsoninelor asupra microbilor, deoarece microbi sensibilizați cu ser proaspăt, centrifugați, apoi spălați și puși în contact cu plachete spălate și încălzite la 61°, — temperatură la care acțiunea plasmatică e înlăturată, - sunt aglutinați intens și repede.

Era de așteptat ca funcțiunea aceasta „antixenică" a plachetelor normale să fie mult mai netă și mai intensă cu plachetele animalelor imunizate. *Rieckenberg* (18) în 1917 descrie următorul fenomen: sângele animalelor imunizate contra trypanosomiazei pus în contact cu trypanosome de aceiași origină cu cele cari determinaseră infecțiunea, acestea la început foarte mobile se lipesc de plachetele sanguine și sfârșesc prin a fi complect acoperite de ele. Această reacție e strict specifică, nu se produce decât cu sursa de trypanosome care infectase animalul.

In urmă *Marie Richter* (17) a încercat să stabilească dacă reacția lui Rieckenberg corespunde unui fenomen general și se aplică la microbi. Din examenele sale făcute asupra sângelui total sau plasmei citratate bogată în plachete, dela iepuri imunizați contra stafilococului și streptococului reeșia că nu se produce nici o alipire între microbi și plachete.

Cum rezultatele erau în complectă contradicție cu ceace obținuse Delrez și Govaerts în primele lor cer-

cetări, acesta din urmă (10) a reluat experiențele Mariei Richter, a confirmat lipsa de acolare a microbilor de plachete între lamă și lamelă (așa cum lucrase M. Richter, probabil datorită imobilității elementelor, în schimb fenomenul in vitro se petrecea cu o intensitate și o rapiditate extremă.

Acestea sunt printre datele cele din urmă pe care le-am putut găsi asupra funcțiunei antixenice a plachetelor normale și imune.

Relativ la faptul dacă anticorpii într'un ser imun sunt sau nu legați de plachetele sanguine, nu am găsit în literatură decât un singur studiu al lui *Studitzki* (20). El cercetează proprietățile diferitelor elemente ale sângelui de cal imunizat contra erizipelului și ajunge la următoarele concluzii: anticorpii se găsesc numai în plasmă sau sângele total citratat. Plachetele și mai ales hematiile sunt aproape complect lipsite de anticorpi.

In general cercetările privitoare la proprietățile biologice ale plachetelor deplasmatizate au dat rezultate puțin nete.

Fragilitatea și alterarea rapidă a acestor elemente, technica delicată pe care o necesitează cercetările întreprinse asupra lor, legitimează în parte discordanțele între diferitele rezultate obținute de diferiți cercetători.

Pentru a răspunde la chestiunea pe care ne-am pus-o și anume *dacă plachetele au sau nu un rol în elaborarea antitoxinei* (antilysinei) *stafilococice* am procedat după cum urmează:

Plachetele animalelor imunizate, izolate de plasma lor sau cu ser de animal normal, sau cu ser de animal imunizat au fost cercetate asupra acțiunei lor antilytice comparativ cu acțiunea antilytică a unui ser imun sau a plachetelor normale.

Iată în detaliu technica utilizată, precum și modul cum am dispus experiențele.

Epurele odată imunizat era sângerat à blanc din carotidă în tuburi parafinate. Din acestea sângele se scurgea imediat în alte tuburi tot parafinate în cari se adaogă o cantitate suficientă de oxalat de Na 1% pentru ca diluția în sânge să fie de 1‰.

Astfel în tuburi cu capacitate de 50 cmc. puneam 4 cmc. oxalat iar restul de 36 cmc. sânge. Agitam bine sângele și-l repartizam apoi în tuburi lungi și subțiri parafinate unde stetea o noapte la rece pentru a se sedimenta. A doua zi plasma de deasupra, bogată în plachete, era recoltată, iar plachetele deplasmatizate după metoda dată de Aynaud, (1).

Se centrifughează plasma cu viteză $^1/_4$ oră cu centrifuga Jouan, în tuburi cu fundul rotund de 50 cmc. capacitate și parafinate, Plasma e aruncată iar depozitul care e aderent spălat de 2—3 ori cu ser fizilologic oxalatat.

Ser fiziologic	90
Oxalat 2 %	10

Depozitul e emulsionat cu grijă în apă sărată oxalatată (se pune o cantitate egală cu plasma scoasă). Această emulsie bogată încă în hematii e trecută în tuburi cu pinten parafinate și centrifugată cu viteză mică — la centrifuga de mână — controlând adesea emulsia la microscop, până când toate globulele roșii și albe au căzut la fund.

Se decantează lichidul cu plachete, care e din nou centrifugat cu viteză ca să cadă toate plachetele. Depozitul e emulsionat în ser fiziologic oxalatat și recentrifugat. Operația e repetată încă de 2 ori ca să fim siguri că orice urmă de plasmă a dispărut. Spălarea terminată, *depozitul de pla-*

chete e emulsionat în o cantitate de ser fiziologic egală cu plasma culeasă.

Primele experienţe de orientare le-am dispus în acest fel.

Tablou No. II.

Serul imun împedică hemolyza în cantitate de 0,0075 cmc.

Stafilolysină	Plachete vaccinate în ser fiziologic	Plachete normale în ser fiziologic	Ser fiziologic	Emulsie hematii iepure 1 %	Rezultat
0 1	1 cmc	—	1 cmc.	5 cmc.	Hemolyză parţială 70
0 1	2 cmc.	—	—	5 cmc.	„ „ 40
0.1	—	1 cmc.	1 cmc.	5 cmc.	„ „ 70
0.1	—	2 cmc.	—	5 cmc	„ „ 40
C. I 0.1	—	—	—	5 cmc.	Hemolyză totală
C. II —	—	—	—	5 cmc.	O

Sistemul stafilolysină + plachete e ţinut 1/2 oră la 37°, se adaogă apoi globulele roşii şi se ţine din nou 1 1/2 oră la 37°. Rezultatele se citesc a doua zi.

Măsurătoarea gradului de hemolyză e făcută cu ajutorul unei scare colorimetrice constituită în modul următor: Un amestec de 1 cmc. globule roşii de epure spălate, cu 119 cmc. apă distilată dă hemoliză totală. Aceasta se înseamnă cu 100. Prin diluţii succesive se obţine o scară cu nuanţe de intensitate descrescândă care se înseamnă cu cifrele 95, 90 etc.

Din acest tablou rezultă că plachetele vaccinate ca şi cele normale au uşoară acţiune împedecătoare asupra hemolyzei. Acţiunea plachetelor vac-

cinate nu e însă deloc mai pronunțată decât a celor normale.

Aceste rezultate ne-au condus la o modificare a dispozitivului de mai sus pentru a ne putea da seamă dacă serul adăogat la plachete nu ar influența modul lor de acțiune.

Tablou No. III.

Serul imun împedică hemolyza în cantitate de 0,003 cmc.
Serul normal întrebuințat nu împedică hem. nici în doză de 1 cmc.

Stafilolysină	Emulsie de plachete vaccinate, în ser fiziologic	Emulsie plachete normale în ser fiziologic	Emulsie de hematii iepure 1 %		Rezultat
0.05	1.5 cc.	—	5 cmc.	—	Hem parț. 50
0 06	1 5 + 0 1 ser normal	—	5 cc.	—	Idem.
0.06	1 5 + 0 001 ser imun	—	5 cc.	—	Idem.
0 06	—	1.5	5 cc.	—	Idem
0.06	—	1.5 + 0.001 ser imun	5 cc	—	Idem
0 06	—	1 5 + 0.003 ser imun	5 cc.	—	O
0 06	—	1 5 + 0.1 ser normal	5 cc.	—	Hem. parț. 50
0 06	—	1.5 + 0 1 ser nor 56°	5 cc.	—	Idem
C. I 0.06	—	—	5 cc.	—	Hem. totală
C II 0.06	—	—	5 cc.	0.003 ser imun	O
C. III 0.06	—	—	5 cc.	1 cc. ser normal	Hem. totală
C. IV —	—	—	5 cc.	—	O

Experiențele făcute cu plachetele celorlalți iepuri imunizați au fost dispuse exact în acelaș mod și rezultatele obținute au fost identice.

CONCLUZIUNI

1. O stafilolysină activă se obţine uşor întrebuinţând mediul de cultură indicat de Walbum. Adăogirea de glucoză în proporţie de $1^0/_{00}$ favorizează considerabil producerea stafilolysinei.

2. In serul epurilor normali se găseşte o antistafilolysină naturală al cărui titru variază dela un animal la altul. Din titrările efectuate pe 40 seruri normale reese că $32^0/_0$ nu împedică deloc hemolyza în cantitate de 1 cmc., iar restul de $68^0/_0$ împedică în cantităţi cari variază între 0,05 şi 1 cmc.

3. Animalele normale al căror ser posedă o putere antistafilolytică însemnată, nu sunt în mod necesar acelea care produc serul cel mai bogat în anticorpi după imunizare.

4. Din cercetările noastre rezultă că în imunizarea iepurilor contra stafilolysinei trebue dată preferinţă căii intramusculare.

5. Plachetele animalelor imunizate au o uşoară acţiune împedicătoare asupra hemolizei prin stafilolysină.

Această acţiune o manifestă şi plachetele normale în acelaşi grad.

6. Atât serul normal cât şi cel imun în cantităţi

neîmpedicătoare sunt incapabile să mărească acțiunea plachetelor izolate.

7. Din ce precede rezultă că anticorpii (contra stafilolysinei) în sângele unui animal imunizat se găsesc în ser și nu par a fi legați de plachete.

Văzută și bună de imprimat

Președintele tezei,
Prof. Dr. Cantacuzino I.

Decanul Facultății,
Prof. Dr. Minovici Mina

In afară de subiectul tezei, candidatul este dator a răspunde la orice chestiuni medicale ce i se vor pune de către juriul examinator.

BIBLIOGRAFIE

1. *Aynaud.* Les globulins (Traité de sang A. Gilbert et Weinberg).
2. *Aynaud.* Action des microbes sur les globulins. C. R. B. 1911, 14 Ian.
3. *Delrez* et *G. Govaerts.* L'intervention des globulins dans l'elimination des microbes injectés dans la circulation. C. R. B. 26 Ian. 1918.
4. *M. v. Eisler.* Ueber antihämolysine. Wien. Klin. Woch. 1905, T. XVIII.
5. *M. v. Eisler.* Ueber die Antihämolysine des normalen serum. Wien. Klin. Woch. 1905, T. XVIII.
6. *L. Famulener.* A report of immunization curves derived from goats treated with certain hämolytic bacterial toxins (vibriolysin aud stafilolysin). Central, f. Bakt. 1907, T. 44.
7. *P. Govaerts.* Le rôle des plaquettes sanguines dans l'immunité naturelle. C. R. B. 26 Ian. 1918.
8. *P. Govaerts.* Intervention des opsonines dans le phénomène d'accolement des microbes aux plaquettes sanguines C. R. B. 21, Febr. 1920.
9. *P. Govaerts.* Effets de l'injection de plaquettes lavées sur l'élimination des microbes circulant dans le sang. C. R. B. 8 Oct. 1921.
10. *P. Govaerts.* L'accolement des microbes aux plaquettes dans le sang d'animaux immunisées. No 16, 1922.

11. *Guyonnet.* Les Hémolysines bactériennes. Thèse de Paris 1919.
12 *R Krauss* und *G. Clarmont.* Ueber Hämolysine und Antihämolysine. Wien. Klin. Woch. No. 3, 1900.
13. *Krauss* und *Levaditi.* Handbuch der Technik und Metodik der Immunitätsforschung. Band II. p. 223.
14. *Krauss* und *Lipschütz.* Ueber Bakteriohämolysine und Antihämolysine. Zeit. f. Hyg. T. XLV 1904.
15. *T. Madsen.* Ueber Tetanolysin. Zeit. f. Hyg. 1. 32 1899.
16. *M. Neisser* und *F. Wechsberg.* Ueber das Staphylotoxin. Zeitsch. f. Hyg. und Inf. T. 36. 1901.
17. *M. Richter.* Zur Kenntnis der Rieckenbergschen Reaktion, Zeitshr, f. Imm. Orig. T. XXXII 1921.
18. *Rieckenberg.* Eine neue Immunitätsreaktion bei experimenteller. Trypanosomeninfektion : die Bluttplättchenprobe. Zeitschr. f. Immunitäts f. Orig. T. XXV 1917.
19. *I. Roskam.* Fonction antixénique, plasme et globulins. C. R. B. 3 Oct. 1921.
20. *Studitzky.* Uber die immunisierenden Eigenschaften verschiedener Blutelemente. Weterinaroje Obosrenie 1913 [Refer. în : Centralbl. f. Bakt. 1914 B. 61].
21. *Walbum.* Studien ueber die Bildung bakteriellen Toxine (staphylolysin) Biochemische Zeit. Mai 1922.